



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för kliniska vetenskaper

# **Gonadosomatiskt index hos hanhundar – samband mellan testikelstorlek och spermiemorfologi**

*Josefine Dahl*

*Uppsala  
2017*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2017:19*



# Gonadosomatiskt index hos hanhundar - samband mellan testikelstorlek och spermiemorfologi

Gonadosomatic index in male dogs – association between testicular size and sperm morphology

*Josefine Dahl*

*Handledare: Eva Axné, institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Jane Morrell, institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0736

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2017:19

**ISSN:** 1652-8697

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Testikelstorlek, testikelmätningar, pungomkrets, spermiekvälité, spermiemorfologi, hund

**Key words:** Testicular size, testicular measurements, scrotal circumference, sperm quality, sperm morphology, canine

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## **SAMMANFATTNING**

Det finns relativt lite publicerat om spermiekvälité hos hund och dess relation till fertilitet jämfört med tjur, hingst och andra domesticerade arter. En viktig del vid utvärdering inför avel är att uppskatta den potentiella spermieproduktionen. Hos flertalet djurarter används testikelmått för att utvärdera fertiliteten då det finns en korrelation mellan testikelstorleken och testikelvikten, vilket är korrelerat med spermieproduktionen. Hos hund varierar testikelmåttet kraftigt med ras eftersom testikelstorleken är relaterad till hundens kroppsstorlek och vikt, vilket måste tas hänsyn till vid bedömning om testikelstorleken är normal eller inte.

Syftet med examensarbetet var att se om det fanns ett samband mellan testikelstorleken och spermimorfologin hos hanhundar genom att studera spermimorfologin i relation till hundars gonadosomatiska index (testikelvikt/kroppsvikt). I studien ingick 16 hanhundar vars testiklar samlades in efter kastration. Testiklarna vägdes och dess längd, höjd och bredd mättes samt spermier från bitestikelsvansen samlades in. Bedömning av spermiekvälitén gjordes med avseende på spermimorfologin.

Resultatet visade att gonadosomatiskt index inte var korrelerat med spermimorfologi. Det fanns inget samband mellan gonadosomatiskt index och procent övriga spermier och inte heller med procentandelen patologiska huvuden. Däremot verkar gonadosomatiskt index indikera på om hunden producerar spermier eller inte. Hundarna i studien som inte producerade spermier hade ett lågt gonadosomatiskt index i jämförelse med hundarna som kunde producera spermier.

Tidigare studier har visat att testikelvikt är starkt korrelerad med testikelvolym och testikelbredd samt att hundens kroppsvikt är positivt korrelerade med testikelvikt och testikelvolym, vilket även sågs i denna studie.

Sammanfattningsvis skulle fler studier behöva göras med avseende på gonadosomatiskt index och spermiekvälité hos hund. Ett större antal hundar med större variationer i spermimorfologi behöver inkluderas samt att flera parametrar i spermiekvälitén behöver utvärderas för att få en bättre utvärdering av fertiliteten.

## **SUMMARY**

There is relatively little published about sperm quality in dogs and its relationship to fertility compared to bulls, stallions and other domesticated species. Estimating the potential sperm production is an important part of the breeding soundness evaluation. In many different species testicular measurements is used to evaluate fertility as a correlation between testicular size and testicular weight, which in turn is correlated with sperm production. Since testicular size is related to body weight the measures vary with dogs because of their great diversity in size and breeds. When evaluating normal testicular size in dogs, consideration must be given to testicular size in relation to body weight.

The aim with this study was to see if there is an association between testicular size and sperm morphology in male dogs by studying the sperm morphology in relation to dogs gonadosomatic index (testicular weight / body weight). The study included 16 dogs whose testes were collected after castration. The testes were weighed and its length, height and width were measured and epididymal spermatozoa were collected. Assessment of sperm quality was made on sperm morphology.

The results showed that gonadosomatic index was not correlated with sperm morphology. No correlation between gonadosomatic index and percent remaining sperm or the percentage of pathological heads was found. In contrast, the gonadosomatic index indicates whether the dog produces sperm or not. The dogs in the study that did not produce sperm had a low gonadosomatic index in comparison with the dogs that could.

Previous studies have shown that testis weight is strongly correlated with testicular volume and testicular width and that the dog's body weight is positively correlated with testis weight and testicular volume, which also could be seen in this study.

In conclusion, more studies are needed regarding gonadosomatic index and semen quality in dogs. A larger number of dogs with larger variations in sperm morphology need to be included and several parameters of sperm quality need to be evaluated to get a better evaluation of fertility.

# INNEHÅLL

INLEDNING .....	1
LITTERATURÖVERSIKT.....	2
Testikelutveckling .....	2
Spermatogenes .....	2
Utvärdering av spermie kvalitén .....	3
Spermiemorfologi.....	4
Testikelstorlek, ett mått på fruktsamhet .....	5
MATERIAL OCH METODER.....	7
Djur.....	7
Insamling av material .....	7
Testikelstorlek .....	7
Spermiemorfologi.....	8
Statistik.....	9
RESULTAT .....	9
Testikelstorlek .....	9
Spermiemorfologi.....	12
Gonadosomatiskt index .....	14
DISKUSSION .....	16
KONKLUSION.....	18
TACK.....	19
REFERENSER.....	20

## INLEDNING

Det finns relativt lite publicerat om spermiekvälité hos hund och dess relation till fertilitet jämfört med tjur, hingst och andra domesticerade arter. Onormal spermieformologi förknippas med infertilitet hos hund men det finns få beskrivningar av vad specifika morfologiska spermiedefekter har för påverkan på fertiliteten (Feldman och Nelson, 2004).

Testikelstorlek (bredd eller omkrets) används i stor utsträckning för att utvärdera fertilitet hos flertalet djurarter, bland annat hos tjur (Eriksson *et al.*, 2012), bagge (Braun *et al.*, 1980; Söderquist och Hultén, 2006) och hingst (Thompson *et al.*, 1979). Hos produktionsdjur är det vanligt att testikelmått används för att bedöma fruktsamhet. Flertalet studier har visat att det finns en hög korrelation mellan pungomkretsen och testikelvikt hos bland annat tjur, vilket är korrelerat med spermieproduktion och spermiekvälité (Gipson *et al.*, 1985; Menon *et al.*, 2011; Eriksson *et al.*, 2012). Detta har även setts hos hund, men då i korrelation med testikelns bredd (Olar *et al.*, 1983).

Testikelstorleken är relaterade till hundens kroppsstorlek och vikt (Woodall och Johnstone, 1988a; Günsel- Apel *et al.*, 1994). Hos hund varierar dock testikelmåttet kraftigt med ras eftersom hundar har stor variation i kroppsstorlek och vikt. Vid bedömning om testikelstorleken är normal eller inte hos hund, måste hänsyn till testikels storlek i förhållande till kroppsvikt tas. Därför skulle möjligen gonadosomatiskt index vara ett mer användbart mått än enbart testikelstorlek där längd, höjd och bredd mäts. Gonadosomatiskt index är förhållandet mellan den totala gonadvikten och kroppsvikten som vanligen uttrycks i procent och kan vara ett användbart verktyg för att bland annat mäta könsnognad i samband med testikelutvecklingen.

I denna studie har spermiekvälité i relation till hundars gonadosomatiska index (testikelvikt/kroppsvikt) undersökts. Syftet med studien var att se om det fanns ett samband mellan testikelstorlek och spermieformologi hos hanhundar. Bestämning av testiklarnas storlek och dess relation till spermiekväliten kan vara till stor hjälp vid bedömning av könsnognadens utveckling, diagnostisering och behandling av sjukdomar i könsorganen och inte minst inom avelsarbetet.



## LITTERATURÖVERSIKT

### Testikelutveckling

Normal testikelutveckling styrs av ärftliga, hormonella och mekaniska faktorer. Den avgörande faktorn för att de primära gonadanlagen ska differentieras till testiklar är Y-kromosomen. De embryonala testiklarna producerar två viktiga hormoner, testosteron och anti-Müllerskt hormon (AMH). AMH styr tillbakabildningen av det honliga gångsystemet (Müllerska gångarna) och förhindrar därmed utvecklingen av honliga könsorgan. Testosteron inducerar bildningen av de inre och yttre könsorganen. Under påverkan av testosteron kommer de Wolffska gångarna att bilda bitestikel och sädesledare (Johnston *et al.*, 2001).

Under könsutvecklingen är testiklarna belägna kaudalt om njurarna. Nedvandringen av testiklarna beror på tillväxtfaktorer som bildas av testiklarna samt förändring i gubernaculum testis, som är en stark bindvävssträng som hjälper till att dra ner testikeln i pungen (Sjaastad *et al.*, 2010). Nedvandringen av testikeln sker passivt och testiklarna passerar genom inguinalkanalen 3 till 4 dagar efter födseln. Hundens testiklar når i allmänhet sin slutgiltiga position i pungen 35 dagar efter födseln. Inguinalkanalen hos hund är öppen tills 6 månaders ålder, vilket gör att testiklarna kan röra sig och blir inte permanent placerade i pungen förrän inguinalkanalen har slutits. Om testiklarna blir kvar i bukhålan eller inguinalkanalen efter 6 månader kan hunden diagnostiseras som kryptokid (Johnston *et al.*, 2001).

Från födelse till början av puberteten växer könsorganen parallellt med tillväxten av resten av kroppen, men under puberteten kommer könsorganen växa mycket snabbare och når gradvis sin fulla storlek och form (Sjaastad *et al.*, 2010). Testikelvikten ökar markant vid 24 till 32 veckors ålder (Johnston *et al.*, 2001).

### Spermatogenes

Spermatogenes är en kontinuerligt pågående process där hanliga könsceller differentieras från stamceller till färdiga spermier. Ungefär 80 % av testikelmassan utgörs av sädeskanaler (*Tubuli seminiferi*) som innehåller två viktiga celltyper, könsceller som blir till spermier samt sertoliceller som förser differentierade könsceller med näring samt reglerar deras mognad. Fram till könsmognad finns endast odifferentierade stamceller (spermatogonier) i testikeln som ligger i direkt kontakt med basalmembranet. Spermatogonier är diploida celler och innehåller två uppsättningar kromosomer, en uppsättning från modern och en uppsättning från fadern. Antalet kromosomer betecknas som (n) och det totala antalet kromosomer i en diploid cell är därmed 2n. Varje nybildad spermatogonie får både en X och en Y kromosom (Sjaastad *et al.*, 2010).

Vid könsmognad börjar produktionen av mogna spermier (spermatozoa). Spermatogonierna genomgår ett antal mitoser ( $2n \times 2$ ), och vid celldelningen återgår alltid minst en cell till lagret av spermatogonier inför nästa cykel. På så sätt är mängden stamceller konstant i testikeln. Den sista spermatogoniemitosen resulterar i en primär spermatocyt ( $2n$ ) som innehåller både en X och en Y kromosom. Under den första meiotiska delningen kommer varje primär spermatocyt att ge upphov till två sekundära spermatocyter ( $n \times 2$ ) som får två kopior av antingen X eller Y kromosomen, men inte båda. De sekundära spermatocyterna genomgår snabbt en andra meiotisk delning. Detta innefattar ingen DNA replikation utan involverar separation av de identiska kromosomparen vilket resulterar i fyra haploida spermater ( $n$ ) som innehåller antingen en X eller en Y kromosom (Berndtson, 2014).

Under spermiogenesen differentieras spermatiderna till spermier. De genomgår flera mognadsfaser och en omfattande förändring i cellarkitekturen sker samt nya organeller bildas. Den ganska stora spermatidkärnan kommer att bilda det lilla kompakta spermiehuvudet med den överliggande akrosomen, mitokondrierna arrangeras utefter spermies mittstycke och utväxande mikrofilament bildar stommen i spermiesvansen, flagellen (Johnston, *et al.*, 2001). Mot slutet i spermiogenesen förlorar spermier kontakten med sertolicellen, varvid överflödigt cytoplasma avlägsnas och spermier vandrar vidare via en vätskeström i testikelns gångsystem till bitestikelgången. Transporten genom bitestikeln tar ca 1-2 veckor, under denna transport mognar spermier och blir motila och befruktningsdugliga. De mogna spermier förvaras i bitestikelsvansen. Denna process tar ca 60 dygn (Sjaastad *et al.*, 2010). Tidpunkten för när en hanhund är köns mogen och har spermier i ejakulatet och kan para sig varierar mellan 5 och 12 månaders ålder beroende på ras och kroppsvikt (Johnston *et al.*, 2001).

### **Utvärdering av spermiekvalitén**

Den vanligaste metoden för insamling av sperma hos hund är via manuell ejakulation (Johnston *et al.*, 2001). Spermier kan också samlas in från bitestikeln efter kirurgisk kastrering, obduktion eller via vaginal sköljning efter naturlig parning (Robert *et al.*, 2016). Målet med utvärdering av sperma, bortsett från undersökningar av patologiska tillstånd, är att förutsäga spermiers fertila förmåga. En hane med optimal fertilitet producerar sperma med en hög andel motila, livskraftiga och morfologiskt normala spermier, medan infertila och subfertila individer uppvisar lågt antal normala livskraftiga spermier (Peña Martínez, 2004).

Utvärdering av sperma innefattar bedömning av bland annat koncentration, total antalet spermier, morfologi och motilitet (Johnston *et al.*, 2001). Normal motilitet beskrivs som en progressiv, snabb framåtrörelse och minst 70 % av spermier bör vara motila hos en normal hanhund (Freshman, 2002). En kombination med bedömning av flera parametrar av spermiekvalitén leder till en bättre värdering av fertiliteten (Robert *et al.*, 2016).

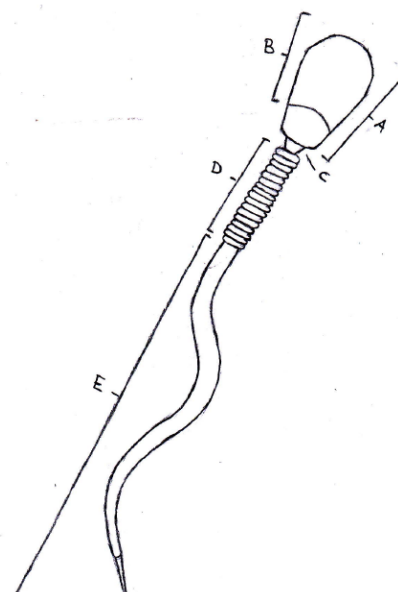
Spermieparametrarna kan bedömas antingen via manuell bedömning eller med hjälp av datoranalys. Rutinmässigt används ljus- och faskontrastmikroskop för bedömning av de vanligaste spermieparametrarna, koncentration, motilitet och morfologi (Robert *et al.*, 2016). Nackdelen med att använda konventionella metoder är att det blir en subjektiv bedömning med variation som grundar sig på betraktarens erfarenhet och mikroskopets kvalitet. Computerized Assisted Sperm Analysis (CASA) gör det möjligt att objektivt bedöma olika spermieparametrar. CASA erbjuder en snabb och noggrann bedömning av spermiekvalitén som möjliggör visualisering av subtila förändringar. Nackdel med denna metod är att det är en relativt hög investeringskostnad och den måste standardiseras och valideras innan praktisk användning är möjlig (Rijsselaere *et al.*, 2005; Rijsselaere *et al.*, 2012).

Hundens spermiekvalité kan variera på grund av förändringar i miljön där sperman samlas, förekomst av sjukdom i hanliga genitalia, systemisk sjukdom, ålder och ras av djuret, samt årstid. Mycket unga och mycket gamla hundar har dålig spermakvalité (Johnston *et al.*, 2001). Det visade två studier där dalmatiner (Schubert och Seager, 1991) och rottweiler (Seager och Schubert, 1996) som var yngre än 6 år hade bättre spermiekvalité, högre total antal spermier per ejakulat och högre andel progressivt rörliga spermier, än de hundar som var äldre än 6 år.

I en studie uppvisade fler irländska varghundar en lägre könsdrift, spermiekvallité och mjukare testikelkonsistens än kontrollgruppen som bestod av hundar från 28 olika raser. Den totala testikelbredden var signifikant lägre hos hundarna med en mjukare testikelkonsistens. De Irländska varghundar som hade en mjukare testikelkonsistens hade även signifikant lägre normala morfologiska spermier än andra irländska varghundar. I kontrollgruppen korrelerade kroppsvikten och totalantalet spermier med totala testikelbredden (Dahlbom *et al.*, 1995). Det gjordes även en uppföljande studie två år senare. Antal onormala spermier hade ökat och spermiernas motilitet hade sjunkit under uppföljningsperioden. Förändringar som utvecklats under uppföljningsperioden tyder på testikeldegeneration. Irländska varghundar är en mycket stor hundras och har en kort förväntad livslängd, vilket kan återspegla tidigare degeneration i kroppen inklusive testiklarna (Dahlbom *et al.*, 1997).

## Spermiemorfologi

Spermien delas in i huvud, hals, mittstycke och svans, där svansen i sin tur kan delas upp i huvudstycke och ändstycke, se figur 1. Huvudet utgörs av cellkärnan som innehåller DNA. Huvudet är sedan täckt av en akrosom, som är en tunn membranomsluten struktur som innehåller enzymer som spermien behöver för att kunna penetrera äggcellens hölje (zona pellucida). I mittstycket av spermien finns mitokondrier som bildar ATP och som förser spermien med energi. Spermies svans, flagellen, bidrar till spermies rörlighet (Sjaastad *et al.*, 2010). En normal hundspermie, oavsett ras, har en totallängd på 6,6  $\mu\text{m}$ , mittstycket har en längd på 1,1  $\mu\text{m}$  och svansen är 5  $\mu\text{m}$  (Johnston *et al.*, 2001).



Figur 1. Skiss över spermies uppbyggnad. A: huvud, B: akrosom, C: hals, D: mittstycke, E: svans. Modifierad efter Feldman och Nelson, 2004. Teckning: Josefine Dahl.

Det finns flera klassificeringssystem för bedömning av spermiemorfologin. Avvikelse i spermies morfologi har traditionellt klassificerats efter vart defekten är lokaliserad (huvud, mittstycke, svans) (Johnston *et al.*, 2001; Feldman och Nelson, 2004). Ett annat sätt att klassificera morfologin är utifrån ursprungsplatsen för defekten, primär defekt (inträffar under spermatogenesisen), sekundär defekt (förekommer under lagringen i bitestikeln eller uppkommer under hanteringen av sperman) (Johnston *et al.*, 2001; Feldman och Nelson, 2004). Det finns även beskrivet en tertiär defekt, där sekundär defekt endast menar defekter på spermier som förekommer under lagringen i bitestikeln och att tertiär defekt uppkommer under hanteringen av sperman (Kaya *et al.*, 2014). Avvikelse hos spermier kan även klassificeras utifrån hur det påverkar fertiliteten; liten defekt, ingen påverkan på fertiliteten eller stor defekt, negativ påverkan på fertiliteten (Johnston *et al.*, 2001).

Onormal spermiemorfologi hos hund kan orsakas av infektion i reproduktionsorganen, feber eller testikeltrauma. Det tar ca 60 dagar för spermier att bildas och därför kan onormal spermiemorfologi förekomma lång tid efter en initial sjukdom/skada (Johnston *et al.*, 2001). Spermiemorfologin återspeglar därför till stor del hälsotillståndet i sädeskanalerna, och i mindre utsträckning även bitestikeln (Menon *et al.*, 2011). Prover som tagits efter en långvarig

sexuell vila som innehåller åldrande spermier från bitestikeln kan innehålla högre andel morfologiskt onormala spermier (Johnston *et al.*, 2001).

Onormal spermimorfologi förknippas med infertilitet hos hund, men det finns få beskrivningar på effekten av specifika morfologiska defekter i samband med infertilitet. Olika spermieavvikelser är kända för att vara av varierande betydelse (Feldman och Nelson, 2004). Spermakvalité och dess relation till fertilitet hos tjur har däremot studerats väl. Distala droppar anses vara en defekt som har mindre betydelse på fertiliteten hos tjurar (Barth och Oko, 1989) och verkar inte heller orsaka nedsatt fertilitet hos katt (Axné och Forsberg, 2007). Förekomst av proximala droppar har däremot en allvarlig påverkan på fertiliteten hos tjur redan vid låg förekomst. Proximala droppar anses vara ett tecken på onormal spermio-genesis och återfinns vanligen med en rad olika spermiedefekter (Barth och Oko, 1989). Onormala spermiesvansar har sannolikt en negativ påverkan på fertiliteten men är inte lika allvarligt som onormala spermiehuvuden. Onormala spermiehuvuden indikerar på testikelförändring och korreleras med fertilitet hos tjur (Barth och Oko, 1989). Förhållandet mellan fertilitet och förekomst av onormala spermiehuvuden ses även hos katt, där katter med hög procentandel onormala spermiehuvuden hade dålig fertilitet (Axné och Forsberg, 2007). Specifik akrosomdefekt (knobbed acrosome) orsakar infertilitet hos tjur och har även dokumenterats hos bagge, vildsvin och hingst (Barth och Oko 1989).

Vanligt förekommande avvikelser i spermimorfologin hos hund inkluderar lösa huvuden, specifik akrosomdefekt, proximal och distal cytoplasmisk droppe, mittstycksfel, enkel svansböjning, svans hoprullad kring huvudet och svans hoprullad under huvudet (Kustritz *et al.*, 1998). Bilder (figur 2 och 3) på olika spermiedefekter hos hund finns under material och metoder. Det finns olika värden rapporterade för den genomsnittliga procentandelen morfologiskt normala spermier (% MNS) hos hund. Historiskt har det föreslagits att en normal hanhund i allmänhet bör ha mer än 70 % morfologiskt normala spermier och att primära och sekundära avvikelser bör utgöra mindre än 10 % respektive 20 % av defekta spermier (Feldman och Nelson, 2004). Johnston *et al.*, (2001) uppger istället att en normal hanhund bör ha  $\geq 80$  % morfologiskt normala spermier.

Positivt samband ses mellan procentandelen morfologiskt normala spermier (% MNS) och fertilitet (Oettlé, 1993), och totala antalet morfologiskt normala spermier och dräktighetsfrekvens hos hund (Mickelsen *et al.*, 1993). Fertiliteten hos hund påverkas negativt när procentandelen morfologiskt normala spermier är 60 % eller lägre. Det visade en studie med syfte att utvärdera spermimorfologins påverkan på fertiliteten hos hundar. I studien var fertiliteten hos hundar med  $> 60$  % normal spermimorfologi 61 % (14 av 23 inseminerade tikar blev dräktiga). Medan fertiliteten hos hundar med  $< 60$  % normal spermimorfologi bara resulterade i 13 % dräktighet (två av 15 inseminerade tikar blev dräktiga) (Oettlé, 1993). Mickelsen *et al.*, (1993) fann istället att totala antalet morfologiskt normala och progressivt rörliga spermier per ejakulat är viktigare för att förutsäga fertiliteten. Dräktighetsfrekvens var inte korrelerad med procentandelen morfologiskt normala spermier utan var korrelerad med totala antalet morfologiskt normala spermier per ejakulat.

### **Testikelstorlek, ett mått på fruktsamhet**

Testikelstorlek (bredd eller omkrets) används i stor utsträckning för att utvärdera fertilitet hos flertalet djurarter. Det finns en stark korrelation mellan testikelstorlek och testikelvikt, vilket är korrelerat med spermieproduktion hos tjur (Gipson *et al.*, 1985), hingst (Thompson *et al.*,

1979), bagge (Braun *et al.*, 1980; Söderquist och Hultén, 2006) och hund (Olar *et al.*, 1983; Woodall och Johnstone, 1988a). Hos tjur används därför pungomkrets som ett objektivet mått på testiklarnas storlek samt som ett indirekt mått på deras spermieproducerande förmåga (Gipson *et al.*, 1985; Menon *et al.*, 2011; Eriksson *et al.*, 2012). Mätning av testikelstorleken betraktas som en billig, repeterbar och objektivet sätt att uppskatta djurets spermieproduktion (Söderquist och Hultén, 2006).

Hos produktionsdjur är det vanligt att testikelmått används för att bedöma fruktsamhet. Det är viktigt att undersöka tjurens potentiella fertilitet eftersom subfertila tjurar försenar befruktningen, förlänger kalvningssäsongen, minskar kalvavvänjningsvikten och ökar utslagningen av kor/kvigor (Eriksson *et al.*, 2012). Det görs genom att tillämpa avels utvärdering (breeding soundness evaluation, BSE), där utöver hälsoundersökning även en andrologisk utvärdering görs. Då ingår mätning av testikelns omkrets, bedömning av spermie kvalitén (morfologi och spermie kvalitét), samt bedömning av tjurens parningsförmåga. BSE har blivit en viktig del i avelsutvecklingen hos produktionsdjur men även ur ett ekonomiskt perspektiv (Menon *et al.*, 2011; Eriksson *et al.*, 2012).

Hos hund är testikelbredden starkt korrelerad med testikelstorleken och testikelvikten, vilket är starkt korrelerad med spermieproduktionen (Olar *et al.*, 1983). Testikelstorleken (längd och bredd) samt spermie kvalitén är relaterade till hundens kroppsstorlek och vikt (Woodall och Johnstone, 1988a; Günsel- Apel *et al.*, 1994). På grund av den stora mångfalden av raser och variationer i kropps vikt finns det problem med denna metod. Woodall och Johnstone (1988a) undersökte testikelbredden som ett index på testikelstorleken hos hund och dess relation till kroppsstorleken. De kom fram till att testikelbredd är ett lämpligt index på testikelstorlek hos hund när det korrigeras med kroppsstorleken, men det är inte ett exakt mått och det finns en stor variation i testikelns bredd. Till viss del kan denna variation vara associerad med rasskillnader. En "normal" testikelbredd betyder inte alltid att hunden producerar spermier. För en fullständig bedömning av hundens fertilitet krävs information om libido, spermie morfologi och motilitet samt totalantalet spermier (Woodall och Johnstone, 1988a).

Noggrann bestämning av testikelvolymen är viktigt vid bedömning av könsmognadens utveckling och vid utvärdering av patienter med sjukdom och trauma som påverkar testikeltillväxten och utvecklingen, men även vid behandling av fortplantningsproblem (Palitel *et al.*, 2002). Testikelvolymen reflekterar spermatogenesis eftersom ungefär 70-80 % av testikelmassan består av sädeskanaler (*Tubuli seminiferi*), vilket korrelerar med totalantalet spermier, spermie morfologi och daglig spermieproduktion (Gouletsou *et al.*, 2007).

Det har gjorts ett flertal olika studier för att uppskatta och räkna ut testikelvolymen på bästa sätt. Det finns en brist på standardisering, olika formler används för att beräkna testikelvolymen baserat på testikelns dimensioner längd (l), höjd (h) och bredd (b) (Palitel *et al.*, 2002). Gouletsou *et al.*, (2007) jämförde skjutmått med ultraljudsmätning och mätningarna gjordes *in vivo* över scrotum (pungen) och återigen *in vitro* efter kastrering. Två olika formler användes för att räkna ut testikelvolymen. Formeln för en ellipsoid;  $(l) \times (h) \times (b) \times 0,5236$  eller den empiriska formeln för Lambert;  $(l) \times (h) \times (b) \times 0,71$ . Resultatet visade att formeln för en ellipsoid ger en överlägsen uppskattning av testikelns volym vid beräkning av testikelvolymen *in vivo* och *in vitro* när skjutmått används och *in vitro* med ultraljudsmätning. Formeln för Lambert är däremot bättre vid beräkning av testikelvolymen *in vivo* med ultraljud. Palitel *et al.*, (2002) jämförde istället orkidometer med ultraljudsmätning

och kom också fram till att undersökning med ultraljud var mer exakt, och att formeln för Lambert gav bäst uppskattning av testikelvolymen. Ultraljud är det mätverktyget som bör användas när objektiva och noggranna mätningar av testikelns volym krävs (Palitel *et al.*, 2002; Gouletsou *et al.*, 2007). Ultraljud är en icke-invasiv metod som utöver undersökning av testikelns form och storlek även möjliggör undersökning av testikelns inre arkitektur, och är därmed ett värdefullt verktyg för bedömning av patologiska förändringar i reproduktionsorganen (Pugh *et al.*, 1990; England, 1991).

Hos svenska alpackor används testikellängden som en indikator för att förutse när alpackor förväntas börja producera spermier. Bäst resultat fås om testikellängd kan kombineras med ålder och Body Condition Score (BCS). På så sätt vet djurhållaren med hög noggrannhet när alpackorna börjar producera spermier. Det är viktigt att veta när honor och hanarna ska separeras i tid för att inte få oönskad dräktighet och för att kunna identifiera bra hanar som ska användas i avelsprogram (Abraham *et al.*, 2016).

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Djur**

Material till den här studien har utgjorts av testiklar från 16 hanhundar. Samtliga hanhundar var privatägda och kom in till olika djurkliniker runtomkring i Uppsala för kastrering, under perioden september till oktober 2016. Djurägarna gav sitt medgivande till att testiklarna fick användas i studien. I samband med mottagandet på kliniken fyllde djurägaren i ett formulär med uppgifter om hundens ras, ålder, vikt, om den blivit kemiskt kastrerad (suprelorin implantat) och i så fall datum och styrka på implantatet (4,7 mg alternativt 9,4 mg). Djurägarna fick även uppges orsak till kastration, främst för att veta om kastrationen skett på grund av sjukdom.

Hanhundarna i studien var av 14 olika raser, mellan åldrarna 6 månader och 9,5 år och med en vikt mellan 6,1 kg och 38,0 kg, och en medianvikt på 17,5 kg. Av de hanhundar som ingick i studien var en kemiskt kastrerad. Den hunden hade fått ett suprelorin implantat på 9,4 mg i slutet på november 2015. Båda testiklarna bedömdes hos hundarna som ingick i studien, kryptokida hundar exkluderades från studien. Främsta orsaken till att hundarna kastrerades var för att minska intresset för löptikar. Andra orsaker till kastration var på grund av prostatahyperplasi och prostatit, perinealbräck, kronisk förhudskatarr och en hund hade epilepsi och kastrerades för att bli lugnare.

### **Insamling av material**

Efter kastration förvarades testiklarna i återförslutningsbar plastpåse (zip-påse) i kylan på kliniken. Testiklarna hämtades samma dag och transporterades i en kylbox till spermalaboratoriet på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala, där de sedan undersöktes. Testiklar som ej kunde hämtas samma dag som kastrationen utfördes uteslöts från studien. Insamlat material till litteraturoversikten har utgjorts av böcker och artiklar från olika databaser så som PubMed, Google Scholar och Web of Science samt från SLU biblioteket.

### **Testikelstorlek**

Hundarna blev kastrerade på obetäckt eller betäckt funikel. Tunica vaginalis klipptes upp och avlägsnades från testiklarna kastrerade på obetäckt funikel. Vänster respektive höger testikel

identifierades. För att på bästa sätt bedöma testikelns storlek fripreparerades bitestikeln fram och avlägsnades från testikeln. Höger respektive vänster testikel och bitestikel vägdes separat. Samma våg användes vid vägning av samtliga testiklar och bitestiklar som är med i studien. Testiklarnas längd (l), höjd (h) och bredd (b) mättes med hjälp av ett skjutmått. Testikelvolymen räknades ut via formeln för en ellipsoid;  $(l) \times (h) \times (b) \times 0,5236$ .

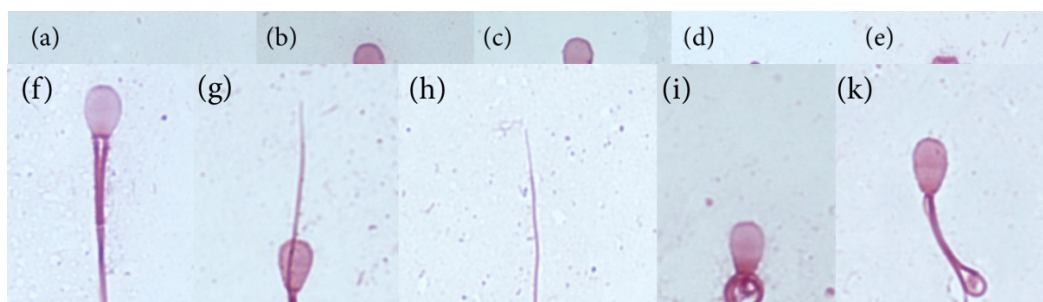
## Spermiemorfologi

Bedömning av spermiekvalitén gjordes med avseende på spermiemorfologin. Spermiernas morfologi är det som är mest stabilt då insamlandet av spermier gjordes från bitestikelsvansen efter kastration. De morfologiska undersökningarna gjordes under ledning från personal på Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala.

Bitestikelsvansen lokaliserades, klipptes av och lades i en petriskål med formol-saline, som är en buffrad formalinlösning som används för att fixera spermier. Bitestikelsvansen skars sönder i spädningsvätskan för att frigöra spermier i vätskan. Vätskan med spermier aspirerades sedan upp med pipett och fördes över till provrör. Proverna förvarades i kylskåpet tills de analyserades.

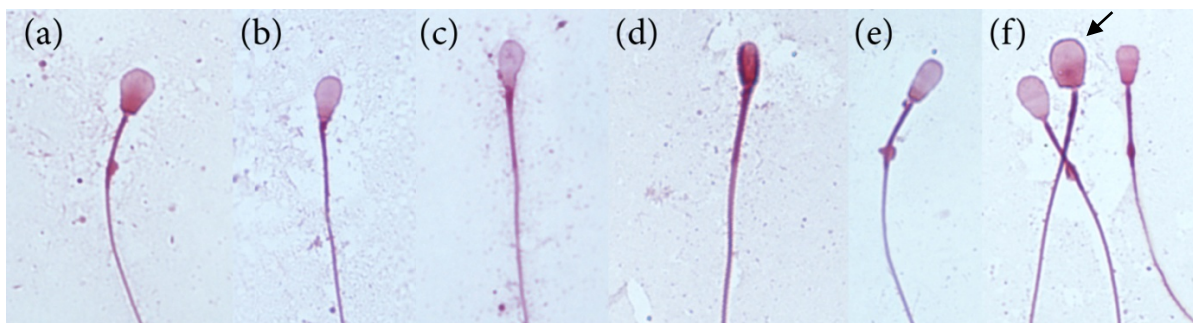
I våtpreparat (formol-saline) bedömdes 200 spermier, med hjälp av faskontrastmikroskop vid 10 x 100 förstoring, med avseende på spermiernas akrosom, mittstycke och svansar. Olika morfologiska defekter som räknades var; proximal cytoplasmisk droppe, lösa huvuden, specifik akrosomdefekt, övriga akrosomfel, kärnsäckar, mittstyckesfel, enkel svansböjning, svans hoprullad under huvudet och svans hoprullad kring huvudet samt dubbelvikta svansar. Distal cytoplasmisk droppe räknades inte eftersom spermier insamlades från bitestikelsvansen och normalt ska distala droppar lossna från spermier under ejakulation.

För bedömning av spermiehuvudernas morfologi gjordes utstryk med Williamfärgning. Utstryken lufttorkade innan färgning. Bedömning av spermiehuvudernas morfologi gjordes manuellt vid 10 x 100 förstoring i ljusmikroskop och 500 spermier räknades. Olika huvuddefekter som räknades var; päronform, smal vid basen, abnorm kontur, outvecklade spermier, lösa defekta huvuden, smala huvuden och huvuden med varierande storlek (liten, stor). Andelen morfologiskt avvikande spermier registrerades som en procentandel av totala antalet räknade spermier. Nedan finns bilder på olika spermiedefekter som bedömdes vid mikroskoperingen (figur 2 och 3).



Figur 2. Exempel på olika spermiedefekter som bedömdes avseende spermiernas akrosom, mittstycke och svansar. Bilderna är tagna i williamfärgning och ej i våtpreparat (formol-saline). (a) normal spermie, (b) proximal droppe, (c) distal droppe, (d) och (e) specifik akrosomdefekt, spermie (d) har även en distal droppe, (f) mittstyckesfel, (g) enkel svansböjning (vid en klassisk svansböjning börjar böjningen av svansen precis vid övergången mittstycke till svans), (h) böjt mittstycke, dock är mittstycket ej skadat så mer troligt en svansdefekt än ett mittstyckesfel. Denna defekt har räknats till gruppen enkel svansböjning vid bedömning. (i) svans hoprullad under huvudet, (j) svans hoprullad runt huvudet, (k) dubbelvikt svans och (l) löst huvud. Foto: Josefine Dahl.





Figur 3. Exempel på olika defekter på spermiehuvudena, bilderna är tagna i williamfärgning. (a) päronform, (b) smal vid basen, (c) abnorm kontur, (d) outvecklad, (e) smal och (f) visar spermier med varierande huvudstorlek, pil visar ett stort huvud, spermien till vänster har normal huvudform och storlek och spermien till höger har ett litet huvud. Foto: Josefine Dahl.

## Statistik

All data analyserades med Minitab version 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA). En statistisk metod som utfördes var linjär regression. Genom regressionsanalys fås en ekvation som beskriver sambandet mellan variablerna, denna linjära modell användes för att förutse vilka värden som kommer fås vid andra mätpunkter och på så sätt kunna förutsäga det ena värdet från det andra. Även korrelationsanalys utfördes för att se hur nära ett linjärt samband det fanns mellan variablerna. Data presenterades som medelvärde  $\pm$  standardavvikelse om inget annat nämndes i texten. Signifikansnivån var satt till  $P < 0,05$ .

## RESULTAT

### Testikelstorlek

I studien ingick 16 hanhundar vars testiklar samlades in efter kastration. Hundarna var fördelade på 14 olika raser, ålder varierade mellan 6 månader och 9,5 år och vikten hos hundarna varierade från 6,1 kg till 38,0 kg. Båda testiklarna undersöktes hos samtliga hundar som var med i studien avseende vikt, längd, höjd, bredd och spermimorfologi. Medeltestikelvikten (summan av båda testiklarnas vikt dividerat med två) varierade från 0,60 g till 17,46 g och den totala testikelvikten varierade från 1,19 g till 45,41 g.

Gonadosomatiskt index varierade från 0,020 % till 0,159 %. Tre av hundarna hade inga spermier i bitestikelsvansen. Hos de hundar som hade spermier varierade gonadosomatiskt index från 0,073 % till 0,159 %. Grunddata över de hundarna som var med i studien kan ses i tabell 1.

Hund	Ras	Ålder	Kropps- vikt (kg)	Total testikel- vikt (g)	Gonadosomatiskt index (%)
------	-----	-------	----------------------	-----------------------------	------------------------------



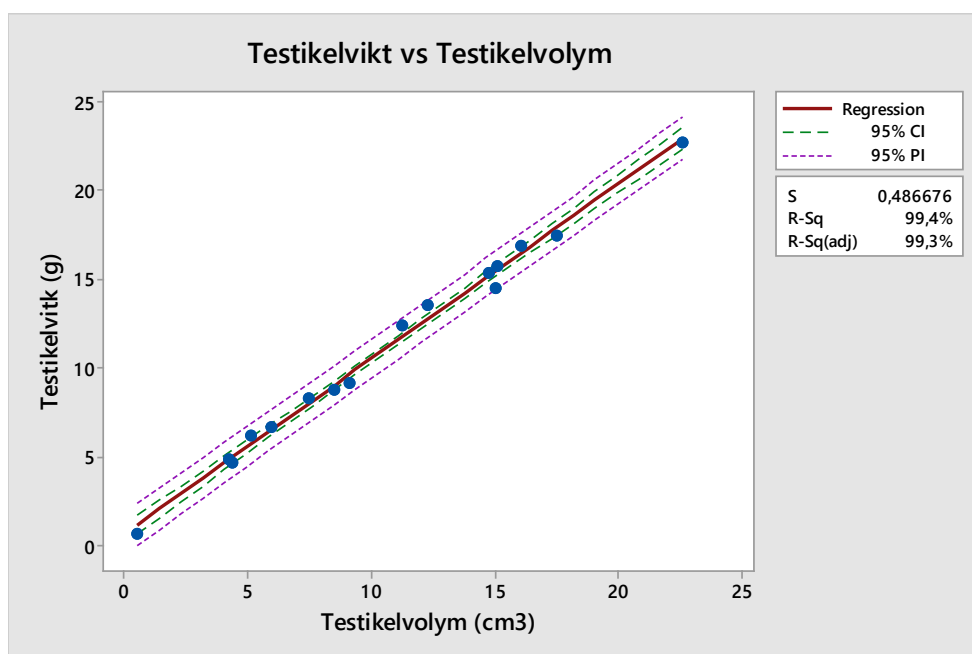
1	Shetland sheepdog*	6 mån	6,1	1,192	0,020
2	Labrador/Border collie	9 mån	27,5	30,710	0,112
3	Lagotto	7 år	16,8	12,328	0,073
4	Eurasier	1,5 år	31,3	34,926	0,112
5	Blandras	7 år	18,0	18,326	0,102
6	Australisk kelpie	8 år	24,2	29,013	0,120
7	Fransk bulldog*	6 mån	12,2	9,685	0,079
8	Golden retriever	8 år	38,0	45,407	0,119
9	Chinese crested dog	4 år	9,0	9,281	0,103
10	Staffordshire bullterier	3 år	17,0	27,047	0,159
11	Whippet	11 mån	15,4	16,537	0,107
12	Irländsk setter #	6 år	36,0	33,678	0,094
13	Jämthund*	7 år	31,2	13,345	0,043
14	Staffordshire bullterier	1 år	16,8	24,685	0,147
15	Pumi	1 år	14,0	17,417	0,125
16	Eurasier	9,5 år	20,7	31,418	0,153

Tabell 1. Grunddata över de hundar som var med i studien

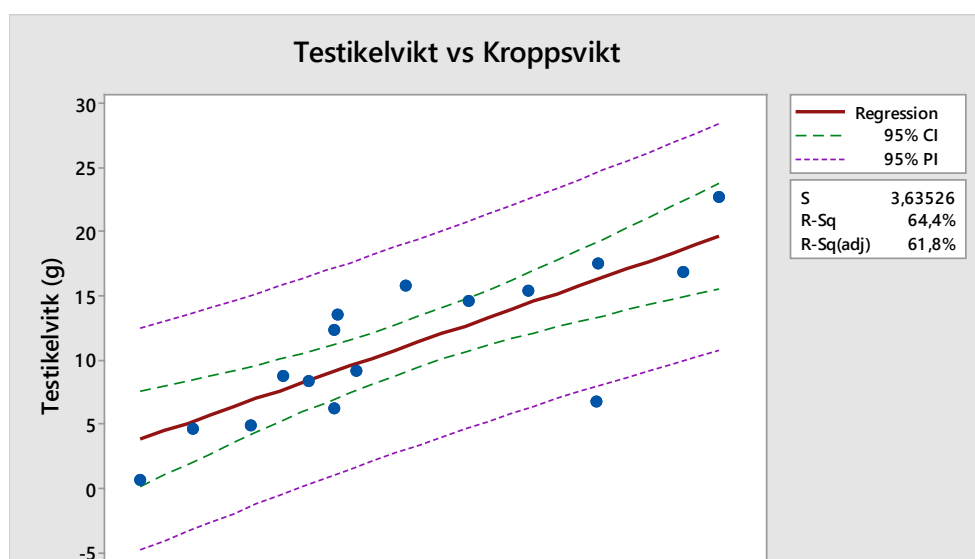
\*Avsaknad av spermier, # Kemiskt kastrerad

Vid jämförelse mellan vänster respektive höger testikel sågs ett starkt samband. För att det skulle bli lättare att jämföra hund mot hund räknades ett medelvärde ut för vänster respektive höger testikel för testikelvikt, testikelvolym, övriga spermier, patologiska huvuden samt samtliga övriga defekter i spermimorfologin hos varje enskild hund. Medelvärdena användes vid statistiska beräkningar om inget annat anges i texten.

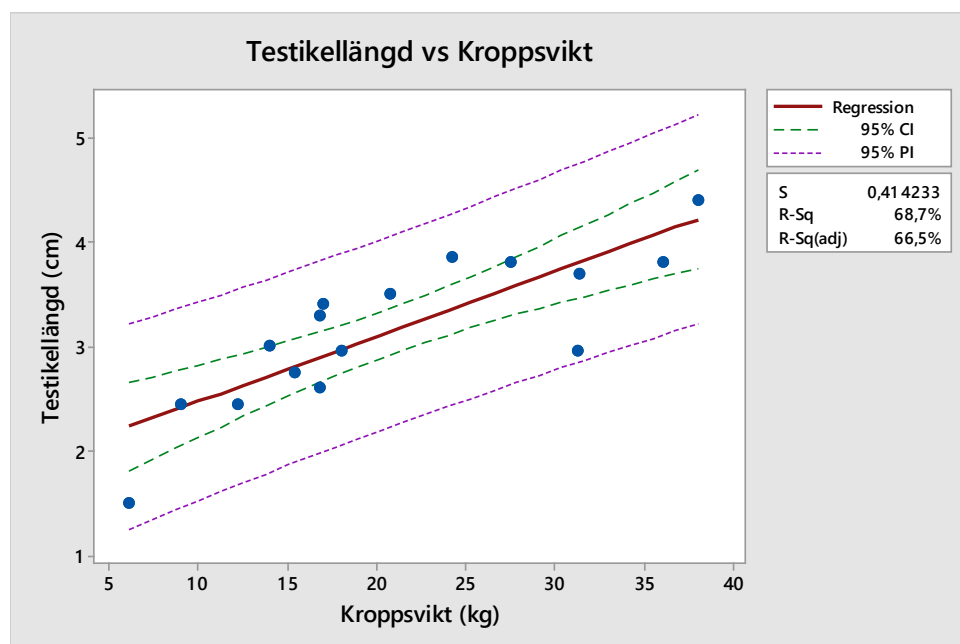
Testiklarna hade en form som en ellipsoid med längd > höjd > bredd. Det fanns en stark korrelation mellan testikelvolym och testikelvikt ( $P < 0,0001$ ), se figur 4. Det fanns även en stark korrelation mellan testikelvikt och testikelbredd ( $P < 0,0001$ ), testikelvikt och bitestikelvikt ( $P < 0,0001$ ), testikelvikt och kroppsvikt ( $P < 0,0001$ ), se figur 5, bitestikelvikt och kroppsvikt ( $P < 0,0001$ ) samt mellan testikelvolym och kroppsvikt ( $P < 0,0001$ ). Korrelation sågs även mellan testikellängd och kroppsvikt ( $P < 0,0001$ ), se figur 6, samt mellan testikelbredd och kroppsvikt ( $P = 0,003$ ), se figur 7, vilket visar att det utifrån kroppsvikt går att beräkna olika mått.



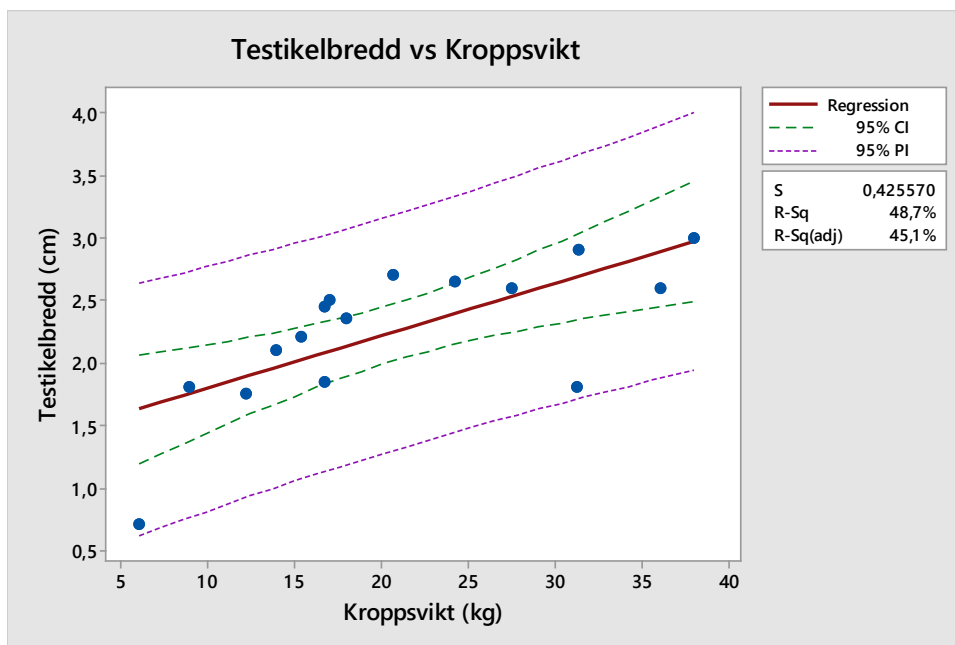
Figur 4. Testikelvikt (g) jämfört med testikelvolym (cm<sup>3</sup>) för samtliga hundar i studien (n= 16 hundar).  $P < 0,0001$ ,  $SD = 0,486676$  och formeln för regressionslinjen var;  $\text{Testikelvikt (g)} = 0,5989 + 0,9897 \text{ Testikelvolym (cm}^3\text{)}$ .



Figur 5. Testikelvikt (g) jämfört med kroppsvikt (kg) för samtliga hundar i studien (n = 16 hundar).  $P = 0,0002$ ,  $SD = 3,63526$  och formeln för regressionslinjen var;  $\text{Testikelvikt (g)} = 0,742 + 0,4955 \text{ Kroppsvikt (kg)}$ .



Figur 6. Testikellängd (cm) jämfört med kroppsvikt (kg) för samtliga hundar i studien (n = 16 hundar).  $P < 0,0001$ ,  $SD = 0,414233$  och formeln för regressionslinjen var;  $\text{Testikellängd (cm)} = 1,850 + 0,06225 \text{ Kroppsvikt (kg)}$ .



## Spermiemorfologi

De vanligaste spermiemorfologiska defekterna hos hundarna i denna studie var proximala droppar och enkel svansböjning, se tabell 2. Hund nummer 6 hade endast 2 % övriga spermier på grund av mycket hög andel proximala droppar. Denna hund bidrar till ett högt medelvärde för proximala droppar och därmed en stor standardavvikelse samt ett lägre medelvärde för övriga spermier och en stor standardavvikelse även där.

Tabell 2. Medelvärde, standardavvikelse samt variationsvidd (min-max) för spermernas morfologi avseende defekter på akrosom, mittstycke och svansar i formol-saline, (n=13 hundar, varav värden från

och har sammanställts) Figur 7. Testikelbredd (cm) jämfört med kroppsvikt (kg) för samtliga hundar i studien (n = 16 hundar).  $P = 0,003$ ,  $SD = 0,425570$  och formeln för regressionslinjen var;  $\text{Testikelbredd (cm)} = 1,367 + 0,0420 \text{ Kroppsvikt (kg)}$ .  
både vänster höger testikel

Morfologi	Medelvärde $\pm$ SD	Variationsvidd
Proximal droppe (%)	10,6 $\pm$ 24,4	0-92,5
Lösa huvuden ( %)	3,0 $\pm$ 1,3	0,5-6
Akrosomdefekt ( %)	0,7 $\pm$ 0,8	0-3
Akrosomfel (%)	0,08 $\pm$ 0,2	0-0,5
Kärnsäck (%)	1,0 $\pm$ 3,4	0-13,5
Mittstycksfel (%)	0,5 $\pm$ 0,7	0-3
Enkel svansböjning (%)	7,0 $\pm$ 11,6	0-40,5
Hoprullade svansar (%)	0,7 $\pm$ 0,9	0-3
Dubbelvikta svansar (%)	0,04 $\pm$ 0,2	0-1

Övriga spermier (%)	76,6 ± 25,8	1,5- 96,5
---------------------	-------------	-----------

Generellt så hade hundarna i studien låg procentandel patologiska huvuden, medelvärde var 6,9 %, se tabell 3. Päronformade huvuden var den defekt som var vanligast bland patologiska huvuden. Resultatet var relativt jämnt mellan hundarna då endast liten spridning i standardavvikelse sågs.

Tabell 3. Medelvärde, standardavvikelse samt variationsvidd (min-max) för spermernas morfologi avseende patologiska huvuden i williamfärgningen, (n=13 hundar, varav värden från både vänster och höger testikel har sammanställts)

Morfologi	Medelvärde ± SD	Variationsvidd
Päronformade (%)	3,7 ± 1,7	1,4-6,8
Smala vid basen (%)	0,5 ± 0,5	0-1,4
Abnorm kontur (%)	0,7 ± 0,3	0,2-1,4
Outvecklade spermier (%)	0,9 ± 0,6	0,2-3
Lösa defekta huvuden (%)	0,2 ± 0,2	0-0,8
Smala (%)	0,08 ± 0,1	0-0,4
Varierar i storlek (%)	0,9 ± 0,7	0,2-3
Patologiska huvuden (%)	6,9 ± 3,1	3-14,2

Tabell 4 visar andelen morfologiskt normala spermier (%). För att få fram andelen normala spermier måste andelen patologiska huvuden dras av från andelen övriga spermier, därmed fås ett intervall där det övre värdet i intervallet motsvarar övriga spermier som räknades i formol-saline och det lägre värdet motsvarar avdraget för patologiska huvuden som räknades i williamfärgningen. Tre av de 16 hundarna som ingick i studien hade inga spermier i bitestikelsvansen, annars var spermiekvaliteten generellt bra hos de flesta hundarna i studien.

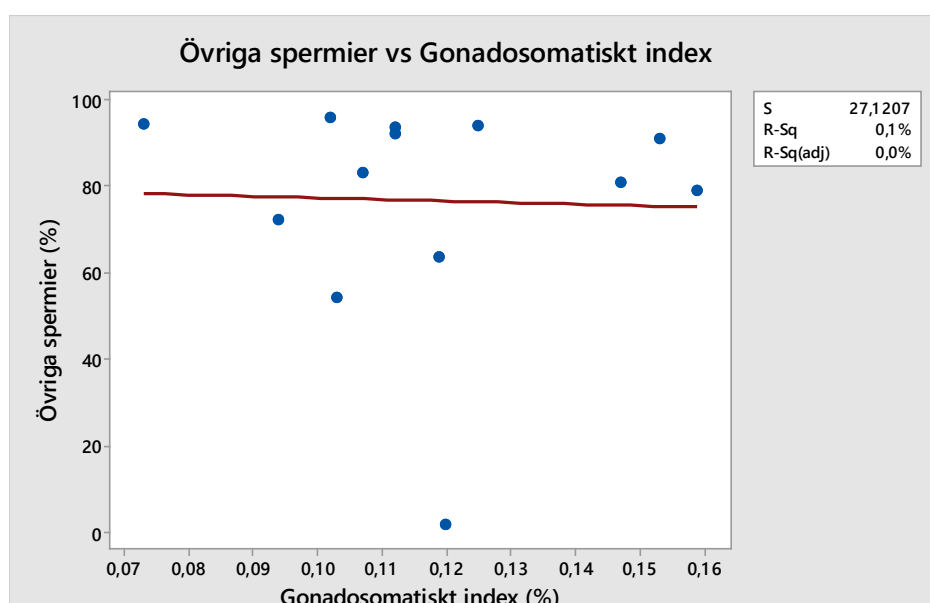
Tabell 4. Andelen morfologiskt normala spermier

Hund	Andel normala spermier (%)		Medelvärde (%)
	Vänster testikel	Höger testikel	
1	Avsaknad av spermier	Avsaknad av spermier	-
2	89-95	84-89	89
3	92-96	90-93	93
4	89-94	88-93	91
5	93-96	90-95	94
6	0-1,5	0-2	1
7	Avsaknad av spermier	Avsaknad av spermier	-
8	47-61	56-66	58
9	47-56	42-52	49

10	74-83	66-75	75
11	90-96	62-70	80
12	60-72	58-72	66
13	Avsaknad av spermier	Avsaknad av spermier	-
14	78-82	75-80	79
15	86-93	87-94	90
16	88-92	85-89	89

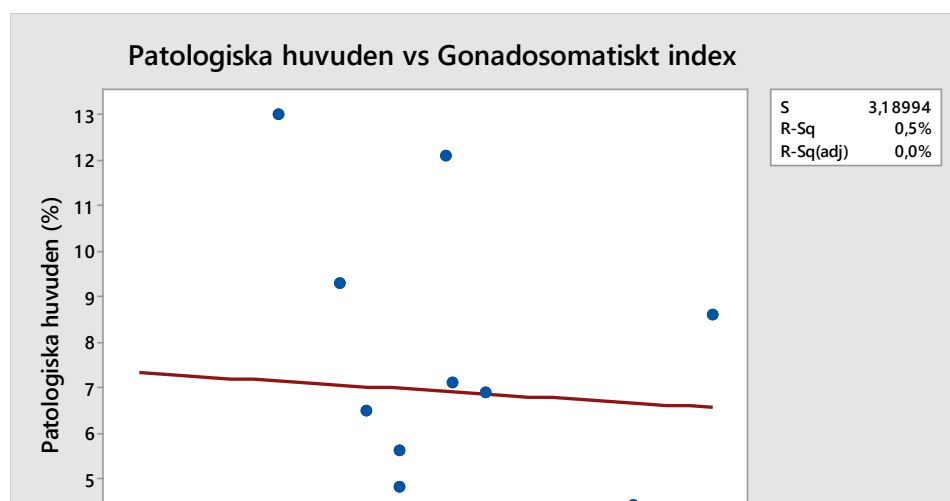
## Gonadosomatiskt index

Procentandelen övriga spermier som räknades i våtpreparat (formol-saline) jämfördes med gonadosomatiskt index och ingen signifikans sågs ( $P = 0,913$ ), se figur 8.



Figur 8. Övriga spermier (%) jämfört med gonadosomatiskt index (%), inget samband sågs ( $n = 13$  hundar).  $P = 0,913$ ,  $SD = 27,1207$  och formeln för regressionslinjen var; Övriga spermier (%) =  $80,87 - 36,1$  Gonadosomatiskt index (%).

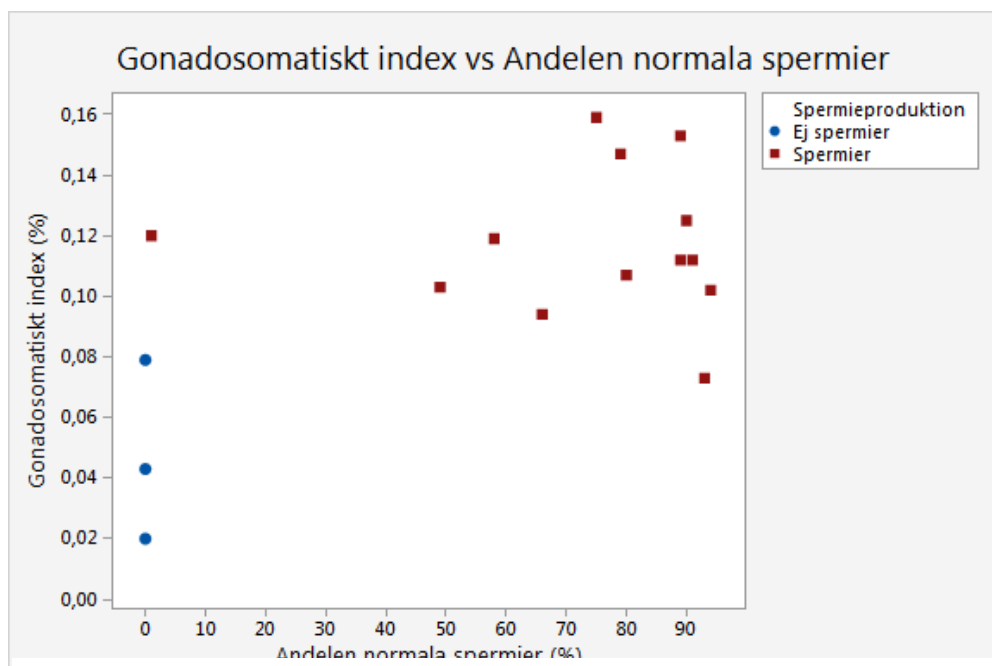
Procentandelen patologiska huvuden jämfördes med gonadosomatiskt index och inte heller där sågs någon signifikans ( $P = 0,817$ ), se figur 9.



Figur 9. Patologiska huvuden (%) jämfört med gonadosomatiskt index (%), inget samband sågs ( $n = 13$  hundar).  $P = 0,817$ ,  $SD = 3,18994$  och formeln för regressionslinjen var; Patologiska huvuden (%) =  $7,977 - 8,98$  Gonadosomatiskt index (%).

R-squared (R-sq) visar hur stor andel av variationen som kan förklaras av modellen, vilket är nästan 0 % vid jämförelse med gonadosomatiskt index och övriga spermier samt patologiska huvuden. Resten av variationen beror på andra faktorer som inte undersöktes eller slumpen. Varje enskild spermiedefekt jämfördes även med gonadosomatiskt index men inget samband sågs där heller. Det fanns inget samband mellan gonadosomatiskt index och ålder ( $P = 0,657$ ).

Tre av hundarna saknade spermier och därför kunde dessa inte vara med i statistiken där gonadosomatiskt index jämfördes med spermimorfologin. För att åskådliggöra dessa hundars gonadosomatiska index jämfördes de med hundarna som producerade spermier utifrån andelen morfologiskt normala spermier, se figur 10. Andelen morfologiskt normala spermier benämns som noll procent hos de hundar som inte producerade spermier då det inte fanns några spermier att bedöma. I punktdiagrammet (figur 10) kan hundarna som inte hade spermier i bitestikelsvansen ses som blått, dessa hundar hade lågt gonadosomatiskt index i jämförelse med de hundar som producerade spermier. Det finns dock en hund som hade relativt lågt gonadosomatiskt index trots bra spermimorfologi vilket kan noteras i punktdiagrammet. Två av hundarna som inte producerade spermier var 6 månader medan en hund var 7 år.



Figur 10. Gonadosomatiskt index (%) jämfört med andelen morfologiskt normala spermier (%) där hundarna som inte producerade spermier ses som blått och där andelen morfologiskt normala spermier hos dessa hundar benämns som noll procent, ( $n = 16$  hundar).

## DISKUSSION

Syftet med examensarbetet var att se om det fanns ett samband mellan testikelstorleken och spermiemorfologin hos hanhundar genom att studera spermiemorfologin i relation till hundars gonadosomatiska index. Resultatet visade att gonadosomatiskt index inte var korrelerat med spermiemorfologin. Det fanns inget samband mellan gonadosomatiskt index och procent övriga spermier och inte heller med procentandelen patologiska huvuden. De flesta hundarna i studien hade relativt bra spermiekvalité. I ett större material med fler hundar med dålig spermiemorfologi är det möjligt att ett samband skulle kunna hittas. Däremot verkar gonadosomatiskt index indikera på om hunden producerar spermier eller inte, då hundarna som inte producerade spermier hade ett lågt gonadosomatiskt index i jämförelse med hundarna som kunde producera spermier.

Tidigare studier har visat att testikelvikten är starkt korrelerad med testikelvolymen och testikelbredden (Olar *et al.*, 1983; Woodall och Johnstone, 1988a). Studier har även visat att hundens kroppsvikt är positivt korrelerade med testikelvikt och testikelvolym (Woodall och Johnstone, 1988a; Woodall och Johnstone, 1988b; Elits, *et al.*, 1993; Günsel- Apel *et al.*, 1994), vilket även sågs i denna studie.

Tre av hundarna som var med i studien hade inga spermier från bitestikelsvansen. Två av dessa hundar var bara 6 månader och en fysiologisk förklaring till detta kan vara att de inte blivit köns mogna än. Tidpunkten för när en hanhund är köns mogen och har spermier i ejakulatet varierar mellan 5 och 12 månaders ålder beroende på ras och kroppsvikt (Johnston *et al.*, 2001). Den tredje hunden som inte hade några spermier var en 7-årig jämthund som dessutom hade mycket små testiklar i förhållande till sin kroppsvikt. Denna hund skulle kunna haft en förvärvad testikeldegeneration, men om han inte har bevisat fertil så kan det också vara något medfött, t.ex. medfödd hypoplasi av testiklarna. I detta fall skulle det vara mycket intressant att titta på histologi på testiklarna.

De hundar som inte hade spermier i bitestikelsvansen hade också ett lägre gonadosomatiskt index. Eftersom koncentration inte var med som en faktor så plockades dessa tre hundar ut ur statistiken när spermiemorfologin bedömdes. Det fanns även en hund (nummer 3) som hade bra spermiemorfologi men ett lågt gonadosomatiskt index. Förklaringen till detta är oklart men det kan bero på individuella variationer. Gonadosomatiskt index räknades fram genom att dela den totala gonadvikten med kroppsvikten vilket innebär att en överviktig hund skulle kunna få ett falskt lågt gonadosomatiskt index. Det skulle därför vara intressant att även bedöma hundarnas Body Condition Score (BCS).

Generellt är spermiekvalitén hos de flesta hundarna bra, det fanns en hund som endast hade 2 % övriga spermier på grund av hög andel proximala droppar. Denna hund räknades som infertil. Hunden producerade rikligt med spermier, vilket kunde ses på gonadosomatiskt index då det var högt. Den äldsta hunden som var med i studien var, 9,5 år och hade en bra spermiemorfologi även om studier visat att hundar över 6 år får sämre spermiekvalité (Schubert och Seager, 1991; Seager och Schubert, 1996). Det visar vilken individuell variation det finns som bör tas hänsyn till.

Hund nummer 8 hade spermier med en ovanlig form, de flesta av spermerna hade en böjning av svansen och vissa en kraftig böjning av svans och mittstycke som ett U. Det gick inte att avgöra om detta var en artefakt eller om det var ett morfologiskt fel. Då inga andra av hundarna i studien hade liknande form på spermerna, känns det mer troligt att det skulle vara en defekt, men spermerna såg inte ut som andra svansfel eller mittstycksfel heller. Spermerna med denna böjning räknades därför till gruppen övriga spermier. Det fanns ingen grupp som kallades "normal" vid räkning av spermier i formol-saline utan de spermier som såg "normala" ut hamnade i gruppen övriga. I formol-saline gjordes ingen bedömning på huvudformen och därför kan det inte avgöras om spermerna var normala eller inte.

Hos en av hundarna (hund 11) varierade spermimorfologin mellan vänster respektive höger testikel, hos övriga hundar var spermimorfologin likartad mellan testiklarna. Vänster testikel hade en bättre spermimorfologi, där andelen morfologiskt normala spermier var 90-96 % jämfört med höger testikel som var 62-70 %. Vänster testikel var även ca 1,2 g tyngre än höger testikel. Hunden kastrerades förebyggande och för att minska intresset för löptikar. Vad den varierade spermimorfologin berodde på kan inte säkerställas, utan kan endast spekuleras kring. Med tanke på att hunden endast var 11 månader gammal så är det inte lika troligt att det skulle röra sig om en enkelsidig testikeldegeneration. Det går inte att utesluta degeneration bara för att det var ett ungt djur men hade varit troligare hos ett äldre djur. Hunden bör nyligen blivit köns mogen med tanke på dess unga ålder. En tänkbar orsak skulle kunna vara att höger testikel var något senare i utvecklingen och att testikeln därför var mindre och spermimorfologin sämre.

En av hundarna (nummer 12) var kemiskt kastrerad med suprelorin implantat 9,4 mg, fick det i slutet av november 2015, och kastrerades i september. Den farmakologiska effekten av deslorelin finns i cirkulationen minst 12 månader efter administrering och därför borde implantatet fortfarande haft effekt vid kastrationen. Implantatet är ett gonadotropinfrisättande hormon (GnRH) som ska undertrycka funktionen hos hypofysgonadaxel och därmed minska könsdriften, spermatogenesisen och testosteron i plasma och på så sätt framkalla tillfällig ofruktsamhet (FASS, 2014). Enligt FASS (2014) är det endast sällsynta fall (0,1 % till < 1 %) där en avsaknad av förväntad effekt rapporterats. Trots att hunden var kemiskt kastrerad hade den en bra spermimorfologi, där andelen morfologiskt normala spermier var 66 %. Denna hund var dock den enda som hade spermier med relativt hög procentandel kärnsäckar i förhållande till övriga hundar i studien. Svårt att avgöra om detta hade att göra med att den var kemiskt kastrerad eller inte men det är ett observandum på att något är fel med spermerna. Patogenesen för hur kärnsäckar uppstår är inte helt klarlagt. Studier på tjur har visat att en hög andel kärnsäckar påverkar fertiliteten (Barth och Oke, 1989). Det hade varit intressant att ha fler kemiskt kastrerade hundar med i studien för att kunna jämföra dem sinsemellan men även för att kunna jämföra mellan icke- kemiskt kastrerade hundar. I och med att endast en hund är kemiskt kastrerad så är det svårt att dra några slutsatser utifrån resultatet. Men med tanke på den höga procentandelen normala spermier så bör denna hund varit fertil, men individuella variationer finns.

Det kan tyckas att två av hundarna i studien har blandats ihop med tanke på att hund 12 som var kemiskt kastrerad hade bra spermimorfologi jämfört med hund 13 som inte var kemiskt kastrerad. Den sistnämnda hunden hade små testiklar och avsaknad av spermier, trots att den inte var kemiskt kastrerad. Det är dock omöjligt att dessa två hundar blandats ihop eftersom de kastrerades med 6 dagars mellanrum på två olika kliniker och testiklarna togs omhand



samma dag som kastrationen utfördes. Testiklarna lades i en zip-påse på kliniken efter kastrationen som markerades tydligt. Om fler än en hund kastrerades samma dag, undersöktes testiklarna var för sig för att det inte skulle kunna blandas ihop.

Prediktionsintervallet (PI) var inte intressant i graferna där övriga spermier och patologiska huvuden jämfördes med gonadosomatiskt index (figur 8 och 9), eftersom inget samband sågs. I graferna där ett samband sågs användes däremot prediktionsintervallet på 95 %, vilket visar bredden av Y-värdet för ett särskilt värde för X. I grafen där testikelvikt jämfördes med testikelvolym (figur 4) så innebär det att 95 % av värdena för testikelvikt ligger för varje värde för testikelvolym inom linjerna. Därmed talar prediktionsintervallet om var en framtida observation troligen ligger.

En studie hos lodjur där gonadosomatiskt index undersöktes visade att kroppsvikt, testikelvikt och gonadosomatiskt index ökar med åldern. Kroppsvikt och testikelvikt var signifikant korrelerade, men gonadosomatiskt index skiljde sig avsevärt hos köns mogna respektive icke-köns mogna hanar. Vilket visar att tillväxten av testiklarna ökar i puberteten och är inte bara relaterade till en ökning i kroppsvikt (Axnér *et al.*, 2009).

Det finns ett antal eventuella felkällor som bör tas hänsyn till. Alla analyser och bedömningar utfördes av mig själv och därför kan ovana att utföra detta påverkat bedömningen och klassificeringen av spermiemorfologin. En nackdel med manuell bedömning av spermiemorfologin är att bedömningen blir subjektiv, vilket grundar sig på betraktarens erfarenheter (Rijsselaere *et al.*, 2005; Rijsselaere *et al.*, 2012). Även om testiklarna hämtades samma dag som kastrationen utfördes så varierade tiden från att hunden kastrerades till att testiklarna hämtades, detta skulle eventuellt kunnat påverka spermiemorfologin. Därför uteslöts testiklar som inte kunde hämtas samma dag som kastrationen utfördes. När det gäller hundens kroppsvikt så hade vissa djurägare/kliniker angivit vikten i hela gram och andra med en decimal vilket då resulterar i mer exakta resultat.

Det finns ett flertal aspekter med denna studie som skulle kunna förbättras. I studien bedömdes endast spermiemorfologin som en parameter av spermiekvalitén. Motiliteten bedömdes inte då den påverkas av lagringstiden och spädningsmediet och på grund av att det generellt är dålig motilitet hos spermier från bitestikelsvansen. Studier har visat att när prostatavätska tillfördes till spermier som samlades från bitestikelsvansen aktiverades spermernas rörlighet och därmed ökade motiliteten (Nöthling *et al.*, 2007; Korochkina *et al.*, 2014). Spermiekoncentrationen bedömdes inte då den i viss mån hade kunnat påverkas av samlingsmetodiken. Däremot gjordes anteckningar om täthet i proven. Det hade dock varit intressant att se om det fanns något samband mellan gonadosomatiskt index och spermiekoncentration då de hundar som inte producerade några spermier, och därmed hade noll i spermiekoncentration, hade lågt gonadosomatiskt index. Dessa två spermieparametrar hade varit intressant att bedöma. Detta var en pilotstudie med få antal hundar, i förlängningen skulle det vara intressant att öka antalet hundar.

Det är viktigt att ha i åtanke att även om testikelstorlek är ett viktigt mått i utvärderingen av fruktsamhet så kan det inte ersätta andra mer specifika metoder som till exempel spermaprov och morfologisk bedömning.

## KONKLUSION

Resultatet visade att gonadosomatiskt index inte var korrelerat med spermiemorfologin. Det fanns inget samband mellan gonadosomatiskt index och procent övriga spermier och inte heller med procentandelen patologiska huvuden. Däremot verkar gonadosomatiskt index indikera på om hunden producerar spermier eller inte. Hundarna i studien som inte producerade spermier hade ett lågt gonadosomatiskt index i jämförelse med hundarna som kunde producera spermier.

Sammanfattningsvis skulle fler studier behöva göras med avseende på gonadosomatiskt index och spermiekvalité hos hund. Ett större antal hundar med större variationer i spermiemorfologin behöver inkluderas samt att flera parametrar i spermiekvalitén behöver utvärderas för att få en bättre utvärdering av fertiliteten.

## **TACK**

Stort tack till min handledare Eva Axner för allt stöd och hjälp under arbetets gång och tack till Karin Selin-Wretling för all hjälp med morfologibedömningen. Även tack till djurkliniken i Uppsala för hjälp med insamling av material till studien.

## REFERENSER

- Abraham, M.C., Puhakka, J., Ruete, A., Al-Essawe, E.M., de Verdier, K., Morrell, J.M. och Båge, Renée. (2016). Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 58 (10), ss. 1-8.
- Axnér, E., Uhlhorn, H., Ågren, E. och Mörner, T. (2009). Reproductive maturation in the male Eurasian lynx (*Lynx lynx*): a study on 55 reproductive organs collected from carcasses during 2002-2005. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 44, ss. 467-473.
- Axnér, E. och Forsberg, L.C. (2007). Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 42, ss. 282-291.
- Barth, A.D. och Oko, R.J. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, ss. 131-239.
- Berndtson, W.E. (2014). Sperm production and its harvest. I: Chenoweth, P.J. och Lorton, S.P. (red), *Animal Andrology: Theories and applications*. Wallingford: CABI Publishing, ss. 11-22.
- Braun, W.F., Thompson, J.M. och Ross, C.V. (1980). Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology*, vol. 13 (3), ss. 221-229.
- Dahlbom, M., Andersson, M., Huszenicza, G. och Alanko, M. (1995). Poor semen quality in Irish wolfhounds: a clinical, hormonal and spermatological study. *Journal of Small Animal Practice*, vol.35, ss. 547-552.
- Dahlbom, M., Andersson, M., Juga, J. och Alanko, M. (1997). Fertility parameters in male Irish wolfhounds: a two- year follow- up study. *Journal of Small Animal Practice*, vol.38, ss. 547-550.
- Elits, B.E., Williams, D.B. och Moser, E.B. (1993). Ultrasonic measurement of canine testes. *Theriogenology*, vol. 40, ss. 819-828.
- England, G.C.W. (1991). Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 32, ss. 306-311.
- Eriksson, P., Lundeheim, N. och Söderquist, L. (2012). Changes in mean scrotal circumference in performance tested Swedish beef bulls over time. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 54 (74), ss.1-6.
- FASS (2014). Produktresumé Suprelorin. Tillgänglig: <http://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20090812000033> [2016-11-16].
- Feldman, E.C. och Nelson, R.W. (2004). Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. I: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3<sup>rd</sup> ed. St Louis: W.B. Saunders, ss. 932-949.
- Freshman, J.L. (2002). Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, vol. 17 (3), ss. 104-107.
- Gipson, T.A., Vogt, D.W., Massey, J.W. och Ellersieck M.R. (1985). Associations of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls. *Theriogenology*, vol. 24 (2), ss. 217-225.
- Gouletsou, P.G., Galatos, A.D. och Leontides, L.S. (2008). Comparison between ultrasonographic and clipper measurements of testicular volume in the dog. *Animal Reproduction Science*, vol. 108, ss. 1-12.
- Günsel- Apel, R-A., Terhaer, P. och Waberski, D. (1994). Hodendimensionen und ejakulatbeschaffenheit fertiler rüden unterschiedlicher körpergewichte. *Kleintierpraxis*, vol. 39, ss. 483-486.
- Johnston, S.D., Root Kustritz, M.V. och Olson, P.N.S. (2001). Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. I: *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, ss. 276-300.

- Kaya, A., Birler, S., Enwall, L. och Memill, E. (2014). Determinants of Sperm morphology. I: Chenoweth, P.J. och Lorton, S.P. (red), *Animal Andrology: Theories and applications*. Wallingford: CABI Publishing, ss. 34-47.
- Korochkina, E., Johannisson, A., Lavanya, G., Morell, J.M. och Axnér, E. (2014). Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, vol. 82, ss. 1206-1211.
- Kustritz, M.V.R., Olson, P.N., Johnston, S.D. och Root, R.K. (1998). The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association*, vol. 34 (4), ss. 348-252.
- Nöthling, J.O., Gerber, D., Colenbrander, B., Dijkstra, M., Bakker, T., De Gramer, K. (2007). The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. *Theriogenology*, vol. 67, ss. 264-275.
- Menon, A.G., Barkema, H.W., Wilde, R., Kastelic, J.P. och Thundathil, J.C. (2011). Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, vol. 75, ss. 241-247.
- Mickelsen, W.D., Memon, M.A., Anderson, P.B. och Freeman D.A. (1993). The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology*, vol. 39, ss. 553-560.
- Oettlé, E.E. (1993). Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl. 47, ss. 257-260.
- Olar, T.T., Amann, R.P. och Pickett, B.W. (1983). Relationships among testicular size, daily production and output of Spermatozoa, and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biology of Reproduction*, vol. 29, ss. 1114-1120.
- Palitel, H.J., Diamond, D.A., Di Canzio, J., Zurakowski, D., Borer, J.G. och Atala, A. (2002). Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurements in dogs. *Radiology*, vol. 222, ss. 114-119.
- Peña Martínez, A.I. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, vol. 82-83, ss. 209-224.
- Pugh, C.R., Konde, L.J. och Park, R.D. (1990). Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology*, vol. 31 (4), ss. 195-199.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D. och Nizanski, W. (2012). Computer- Assisted Sperm Analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 47, suppl. 6, ss. 204-207.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D. och de Kruif, A. (2005). New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*, vol. 64, ss. 706-719.
- Robert, A.M., Jayaprakash, G., Pawshe, M., Tamilmani, T. och Sathiyabarathi, M. (2016). Collection and evaluation of Canine semen – a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*, vol. 5 (3), ss. 1586-1595.
- Schubert, C.L. och Seager, S.W.J. (1991). Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male Dalmatian. *Canine Practice*, vol. 16 (5), ss. 17-21.
- Seager, S.W.J. och Schubert, C.L. (1996). Semen collection and evaluation for the clinical assessment of fertility parameters in the male Rottweiler. *Canine Practice*, vol. 21 (6), ss. 30-34.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. och Hove, K. (2010). Reproduction. I: *Physiology of Domestic Animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary press, ss. 684-734
- Söderquist, L. och Hultén, F. (2006). Normal values for scrotal circumference in rams of Gotlandic breed. *Reproduction of Domestic Animals*, vol. 41, ss. 61-62

- Thompson, D.L., Pickett, B.W., Squires, E.L. och Amann, R.P. (1979). Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *Journal of Reproductive and Fertility*, suppl. 27, ss.13-17.
- Woodall, P.F. och Johnstone, I.P. (1988a). Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 29, ss. 543- 547.
- Woodall, P.F. och Johnstone, I.P. (1988b). Dimensions and allometry of testes, epidymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 82, ss. 603-609.